Electronic gene chip preparation method

Patent number:	CN1422960
Publication date:	2003-06-11
Inventor:	FAN CHUNHAI (CN); HUANG QING (CN)
Applicant:	HUANG QING (CN)
Classification:	
- international:	C12Q1/68
- european:	
Application number:	CN20010129100 20011123
Priority number(s):	CN20010129100 20011123

Abstract of **CN1422960**

The invention is a producing method for electron gene chip, its characters are: a. the DNA probe is pointed at the base point of carrier which has metal film, and accomplishes the fixing of DNA; b. the liquid containing electrochemistry activity base are pointed at the fixed DNA surface, the fixed DNA sample end is attached a electrochemistry activity base; The structure of DNA probe is: -NH2-(CH2)n-******+++++++++++******-(CH2)n-SH-, then the metal surface is immersed in SH-(CH2)6-OH through the whole night.

Data supplied from the ***esp@cenet*** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl^7
C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01129100.1

[43] 公开日 2003年6月11日

[11] 公开号 CN 1422960A

[22] 申请日 2001.11.23 [21] 申请号 01129100.1

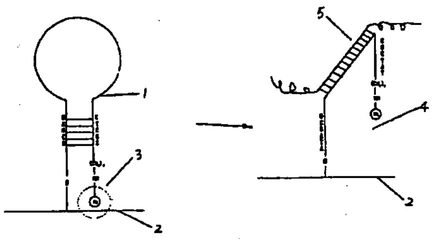
[71] 申请人 黄 庆
地址 610041 四川省成都市八里小区怡福路
华房苑1幢3单元2D
共同申请人 樊春海
[72] 发明人 黄 庆 樊春海

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称 电子基因芯片的制备方法

[57] 摘要

本发明是一种电子基因芯片的制备方法，其特点是 a. 将 DNA 探针点在喷镀有金属薄层的载体的基点上，完成 DNA 的固定；b. 将含有电化学活性基团的溶液点在已固定的 DNA 表面，使已固定的 DNA 样品5’末端带上一电化学活性基团；所述 DNA 探针的结构是：5′-NH_2-(CH_2)n-* * * * * * + + + + + + + + + + + + + + + * * * * * * -(CH_2)n-SH-并将上述带有电化学活性基团的电子基因芯片的金属表面进一步浸于 SH-(CH_2)$_6$-OH 溶液中过夜，本发明所得到的产品——电子基因芯片使得采用电子检测器来检测基因芯片的信号得以实现，由此可以大幅度降低检测成本，实现平民化，进入广泛的应用领域。



ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1、一种电子基因芯片的制备方法，其特征在于制备步骤为：

a.将DNA探针点在喷镀有金属薄层的载体的基点上，完成DNA的固定；

b.将含有电化学活性基团的溶液点在已固定的DNA表面，使已固定的DNA样品5’末端 带上一电化学活性基团；

所述DNA探针的结构是：

5'-NH_2-(CH_2)n-********++++++++++++++++++++********-(CH_2)n-SH-

其中，********所示为两段可以互补配对（A与T配对，G与C配对）的DNA序列；+++++++++++++++++++所示为杂交过程中待检测的特异性DNA片段（如10-30碱基）；所述两端的甲基（CH_2）数量n较好为0～10。

2、根据权利要求1所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于将上述带有电化学活性基团的电子基因芯片的金属表面进一步浸于SH-(CH_2)$_6$-OH溶液中过夜。

3、根据权利要求1所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于所述SH-(CH_2)$_6$-OH溶液的浓度为1-50 mM

4、根据权利要求1所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于所述载体的制备方法是以玻璃片、陶瓷片、塑料片或者硅片为载体，按一定电路设计覆盖上掩模(mask)，在载体或称基质上真空喷镀上一层钛（粘附层），然后再喷镀上一层很薄的金属，形成放置DNA

探针的基点（可多至数百至数千个）以及相应的电路。

5、根据权利要求 4 所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于所述金属是金。

6、根据权利要求 4 所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于进一步对芯片进行预处理，预处理方法是： a.用等离子体处理 30 分钟后，迅速置于乙醇溶液中；或 b.用紫外-臭氧处理箱处理 30 分钟后再用饱和碱溶液（如 KOH）处理；或 c.用 Piranha 溶液(70%浓硫酸/30%双氧水)高温(高于 90℃)处理 20 分钟以上，然后在一定电位（-0.4V~-1.2 V）下在碱溶液（如 KOH，NaOH 等）中进行电化学(循环伏安扫描)清洗。清洗后的芯片保存于乙醇或其它有机溶剂中备用。

7、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于所述 DNA 探针点在载体的基点上完成 DNA 的固定的方法是：将制备好的 DNA 探针点在基点上，覆盖表面后室温反应超过 5 小时。

8、根据权利要求 1 所述的电子基因芯片的制备方法，其特征在于所述制备工艺流程为：a. 在硅片或玻片上镀金，制作基点与电路; b. 进行预处理; c. 将 DNA 点样在基点上; d. 合成电化学基团; e. 表面保护; f. 完成芯片的制备。

电子基因芯片的制备方法

本发明属于基因芯片(Genechip)的制备领域，具体是一种可采用电子检测器对 DNA 杂交过程中电信号产生的变化进行定量检测的电子基因芯片的制备方法。即本发明所得到的电子基因芯片使得采用电子检测器来检测基因芯片的信号得以实现。

基因芯片(Genechip)又称 DNA 芯片（DNAChip)。它是在基因探针的基础上研制出的，所谓基因探针只是一段人工合成的碱基序列，在探针上连接一些可检测的物质，根据碱基互补的原理，利用基因探针到基因混合物中识别特定基因。它将大量探针分子固定于支持物上，然后与标记的样品进行杂交，通过检测杂交信号的强度及分布来进行分析。然而，现有的基因芯片技术在现阶段的应用还有很大的障碍。存在的问题主要由其检测方法所导致，而其检测方法是由其制备方法所决定的，具体表现在以下几个方面：

1、基因芯片的专用设备造价和单次检测成本都很高，一般只有大型制药公司和经费充足的科研院所才能承受。一套商品化的基因芯片信号检测与分析系统，包括荧光扫描仪、计算机及其软件等，大约价值 20 万美元。就应用型基因芯片如诊断芯片来讲，一个很普通的传染病检测芯片单次检测成本就要约二百元人民币。由于成本是能否实现广泛应用的首要问题，所以现有基因芯片普及性应用的

难度非常大。

2、现有基因芯片技术得到的荧光扫描信号，只能认为是一种定性或半定量的信号结果，而不能进行精确的数字化分析。这一方面对基因芯片得到的大量生物学数据的进一步分析带来很大的不便，同时也降低了信号检测的灵敏度与可靠性。

3、现有基因芯片技术要求对样品进行复杂的预处理，主要表现为需对样品进行荧光标记。对于单色荧光标记，虽然预处理过程相对简单，但不能得到很好的信号；而四色荧光标记信号虽然较好，但预处理过程相对复杂。这种预处理过程，需要专业人员经过专门的培训才能够完成。

综上所述，现阶段基因芯片还仅仅停留在实验室阶段，局限于科研领域，离正式投入应用还有相当大的距离。

本发明的目的是为了克服现有技术的缺陷，为人们提供一种可采用电子检测器对DNA杂交过程中电信号产生的变化进行定量检测的电子基因芯片的制备方法，从而解决上述由荧光检测方法带来的一系列问题。即本发明所得到的产品一电子基因芯片使得采用电子检测器来检测基因芯片的信号得以实现，由此可以大幅度降低检测成本。本发明使基因芯片技术成为一种更加低廉、更加准确、更加灵敏的完善的技术，从而实现平民化，进入广泛的应用领域，为全人类造福。

本发明的技术方案是通过下述技术方案来实现的。

本发明的电子基因芯片的制备方法，其特点在于：

a. 将 DNA 探针点在喷镀有金属薄层的载体的基点上，完成 DNA 的固定；

b. 将含有电化学活性基团的溶液点在已固定的 DNA 表面，使已固定的 DNA 样品 5’末端 带上一电化学活性基团；

c. 所述 DNA 探针的结构是：

5'-NH_2-(CH_2)n-********+++++++++++++++++********-(CH_2)n-SH-

其中，********所示为两段可以互补配对（A 与 T 配对，G 与 C 配对）的 DNA 序列；+++++++++++++++++所示为杂交过程中待检测的特异性 DNA 片段（如 10-30 碱基）；所述两端的甲基（CH_2）数量 n 较好为 0～10。

上述方案中，还可以将上述带有电化学活性基团的电子基因芯片的金属表面进一步浸于一定浓度的 SH-$(CH_2)_6$-OH 溶液中过夜，使金属表面未结合 DNA 的部分为醇保护，以防止基质的非特异性吸附。同时也可以使表面的 DNA 排列更为有序。所述浓度为 1-50 mM。

上述方案中，所述载体的制备方法可以采用通用的方法，如以玻璃片、陶瓷片、塑料片或者硅片等为载体。按一定电路设计覆盖上掩模(mask)，在载体或称基质上真空喷镀上一层钛（粘附层），然后再喷镀上一层很薄的金属，较好是金，形成放置 DNA 探针的基点（可多至数百至数千个）以及相应的电路，完成芯片的基质及芯片电路的制作。

上述方案中，还可以进一步对芯片进行预处理，以获得一个具有可重现性的，光滑的金表面，预处理可以采用常用的方法，如以下几种方法：a.用等离子体处理 30 分钟后，迅速置于乙醇溶液中；b.

用紫外-臭氧处理箱处理 30 分钟后再用饱和碱溶液（如 KOH）处理；c.用 Piranha 溶液(70%浓硫酸/30%双氧水)高温(高于 90℃)处理 20 分钟以上，然后在一定电位(-0.4V~-1.2 V)下在碱溶液(如 KOH，NaOH 等）中进行电化学(循环伏安扫描)清洗。以上三种方法均为可行。清洗后的芯片保存于乙醇或其它有机溶剂中备用。

上述方案中，所述将 DNA 探针点在载体的基点上，完成 DNA 的固定的方法可以采用现有技术中的各种常用方法，如：将制备好的 DNA 探针点在基点上，覆盖表面后室温反应超过 5 小时。3’-SH 与 Au 的化学反应形成 S—Au 键，实现表面分子自组装，从而完成 DNA 的固定。

本发明所述所述特异性 DNA 探针可以采用常规的固相合成方法制备并经反相 HPLC 纯化而得到，也可以直接从其它公司购取。

在所述下列：

5'-NH_2-$(CH_2)_3$-********+++++++++++++++++********-$(CH_2)_6$-SH-3'

结构中，********所示为两段可以互补配对（A 与 T 配对，G 与 C 配对）的 DNA 序列,如 GCATGCGC 与 GCGCATGC；ATATCGCA 与 TGCGATAT 等等。在未杂交状态下，这两段 DNA 能够自身折叠，形成茎环结构（Stem－loop)。研究表明，此茎环结构对于目的基因的识别具有高度的亲和性和选择性，可以很好地区分单点突变，使本方法可用于 SNPs（Single Nucleotide Polymorphisms, (单核苷酸多态性）检测。其中+++++++++++++++++所示为杂交过程中待检测的特异性 DNA 片段，其碱基数可以根据用途而设定，如可以是 10～30 个碱基，该段 DNA 决定了该芯片的用途。如该片段为 HIV 病毒 DNA

特征片段，则该芯片可用作进行 AIDS 的检测；同理，如该片段为肝炎病毒 DNA 特征片段，则该芯片可用作进行肝炎的检测。两端的甲基（CH_2）数量可以变化，从没有到数十个均可。

本发明的电子基因芯片的制作工艺流程可以参见附图 2 所示。

本发明的上述技术方案使基因芯片的生产采用了与现有芯片生产完全不同的技术，打破了美国在此领域的垄断。该技术把成熟的微电子技术应用到基因芯片上，目前在全世界处于领先地位。本发明为人们提供了一种可采用电子检测器对 DNA 杂交过程中电信号产生的变化进行定量检测的电子基因芯片的制备方法。即本发明所得到的产品一电子基因芯片使得采用电子检测器来检测基因芯片的信号得以实现，由此可以带来基因芯片的检测技术发生根本性的变革，具体表现为：

1、检测设备造价大幅度降低，用作信号检测的电化学工作站，其造价远远低于现有基因芯片技术中使用的荧光扫描仪。 2、该技术对信号的检测是通过检测茎环结构（step-loop）的形成与破坏来进行。茎环结构（step-loop）在识别目的基因时具有特殊的选择性，可以很好的分辨单点突变。这是原有技术所不能做到的，能够及其显著地提高 DNA 杂交信号的精确性。3、本专利技术得到的电扫描信号，是一种定量的信号结果，能进行精确的数字化分析。这使对基因芯片得到的大量生物学数据的进一步分析成为可能，同时也大大提高了信号检测的灵敏度与可靠性。4、本专利技术使得对待检测的样品不需要任何标记，使得预处理过程只需经过简单的培训，任

何人都能完成。

本发明的产品之所以具有上述优点，其原理在于：在杂交前，由于探针 DNA 两端含有一段可完全配对的 DNA 序列，在自由状态下，能形成径环结构（stem loop）。此时，探针的 5’末端与 3’末端是靠近的，而 3’末端所携带的电化学活性基团在靠近 Au 表面时，能够产生一个能用电化学工作站检测的电信号。杂交完成后，由于位于探针中段的特异性 DNA 片段和样品发生了 DNA 互补配对，形成正常的 DNA 双螺旋结构，从而破坏了径环结构。此时，探针的 5’末端与 3’末端不再靠近，导致了原来的电化学信号的丧失。利用这个原理，能够检测 DNA 是否完成了杂交配对，也即能够检测在所设计的基因芯片上 DNA 的杂交信号。

附图 1 为技术原理图。

图中：1、茎环结构；2、Au 表面；3、产生电信号；4、电信号消失；5、与外源 DNA 杂交配对。

下面通过实施例进一步描述本本发明，本发明不仅限于所述实施例。

实施例一

本例的制备工艺步骤为：

1、 首先，芯片基质选用玻璃片,硅片与陶瓷片，进行试验。在这三种基质覆盖上掩模（上有一小孔及从该孔导出的电路），真空喷镀上一层约 10nm 的钛，然后再喷镀上一层约 300 nm 金，形成 DNA 探针的固定化表面以及电路。检测表面光滑度。经检测，硅片上镀

金后，表面最为光滑。选用硅片基质继续试验。

2、 用以下三种方法处理已镀金的硅片：a、用等离子体处理，然后迅速置于乙醇溶液中；b、.用紫外-臭氧处理箱处理，再用饱和KOH 处理；c.用 piranha 溶液(70%浓硫酸/30%双氧水)处理 30min，然后在一定电位下于 0.5 M KOH 溶液中电化学清洗。结果表明，以上三种方法均为可行未见明显差异。清洗后的芯片保存于乙醇中备用。

3、采用常规的固相合成方法制备并经反相 HPLC 纯化而得到或直接从其它公司购取下述结构的 DNA 探针：

$5'\text{-}NH_2\text{-}(CH_2)_3\text{-GCG AG}-\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}-\text{CT CGC-}(CH_2)_6\text{-SH-}3'$

其中，$\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}$为本实验中选用的特异性 DNA 序列，是pUC18 载体上的一段。

4、人工将制备好的 DNA 探针(1 uL, 1 mM)点在基点上，覆盖表面后室温过夜，此步骤称作点样。3’-SH 与 Au 的化学反应形成 S—Au 键，实现表面分子自组装，从而完成 DNA 的固定。

5、将含有 5 uL,3 mM 电化学基团（羧基二茂铁）的溶液点在已固定的 DNA 表面，再加入 10 mM EDC/10 mM NHS，反应 1h。

6、将硅片浸于 10 mM 的 $SH\text{-}(CH_2)_6\text{-}OH$ 乙醇溶液中，等待杂交。用于电信号检测的基因芯片制作完成。

实验中发现，步骤 2、6 可以省去，但采用后产品质量更好。如采用步骤 2 芯片进行预处理，可以获得一个具有可重现性的，光滑的金表面，有利于后面的点样操作；采用步骤 6 可以使金属表面未

结合 DNA 的部分为醇保护，以防止基质的非特异性吸附。同时也可以使表面的 DNA 排列更为有序，使产品应用于对 DNA 杂交过程中电信号产生的变化进行定量检测时检测精确度更准。

实施例二

本例为实施例一的检测应用例。

1、将实施例一的芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 9uA（对 Ag/AgCl，200mv）。

2、与实施例一相应，用于杂交的 DNA 选用 pUC18 载体，提取 pUC18 质粒 DNA（10uL ，约 1ug），沸水浴 5 分钟，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

3、将变性的 pUC18 质粒点在基点上，37℃保温 2 小时。

4、用双蒸水清洗芯片，并将芯片置于 45℃的双蒸水中漂洗数次，约 30 分钟。

5、取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有 pUC18 质粒。

实施例三

本例为电子基因芯片的制备与检测例，其中芯片的制备与处理同实施例一。简述过程如下：

合成或购买结构如下所示的 DNA 序列：

$5'\text{-NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-ATGCGT}-\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}-\text{ACGCAT-(CH}_2)_6\text{-SH-3}'$

$\boxed{\text{ggatcctctagagtcga}}$为本实验中选用的特异性 DNA 序列，与实施例 1 相同，是 pUC18 载体上的一段，与之相应，用于杂交的 DNA 选用 pUC18 载体。人工将制备好的 DNA 探针(1 uL, 1 mM)点在基点上，覆盖表面后室温过夜。3’-SH 与 Au 的化学反应形成 S—Au 键，实现表面分子自组装，从而完成 DNA 的固定。

将含有 5 uL,3 mM 电化学基团（羧基二茂铁）的溶液点在已固定的 DNA 表面，再加入 10 mM EDC/10 mM NHS，反应约 1h。

将硅片浸于 10 mM 的 $\text{SH-(CH}_2)_6\text{-OH}$ 乙醇溶液中，等待杂交。用于电信号检测的基因芯片制作完成。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 8.7uA（vs.Ag/AgCl，200mv）。

提取 pUC18 质粒 DNA（10uL ，约 1ug)，沸水浴 5 分钟左右，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

将变性的 pUC18 质粒点在基点上，约 37℃保温 2 小时左右。

用 dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于 45℃的 dd H_2O 中漂洗数次，约 30 分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为 2uA（对 Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有 pUC18 质粒。

本实施例与实施例一相比，仅在形成茎环结构的序列发生变化，结果表明，该专利方法中的茎环结构区域的 DNA 序列可以进行变化。

实施例四

本例仍为电子基因芯片的制备与检测例，其中芯片的制备与处理同实施例一。简述过程如下：

合成或购买结构如下所示的 DNA 序列：

5'-NH_2-$(CH_2)_3$-GCG AG—$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$—CT CGC-$(CH_2)_6$-SH-3'

$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$为本实验中选用的特异性DNA 序列，是短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因中的一段，与之相应，用于杂交的 DNA 选用含有这段基因的质粒载体。

人工将制备好的 DNA 探针(1 uL, 1 mM)点在基点上，覆盖表面后室温过夜。

将含有 5 uL,3 mM 电化学基团（羧基二茂铁）的溶液点在已固定的 DNA 表面，再加入 10 mM EDC/10 mM NHS，反应 1h。

将硅片浸于 10 mM 的 SH-$(CH_2)_6$-OH 乙醇溶液中，等待杂交。用于电信号检测的基因芯片制作完成。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为 10uA（vs.Ag/AgCl，200mv）。

提取含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的质粒 DNA（10uL ，约 1ug），沸水浴 5 分钟，迅速置于冰上，使 DNA 变性。

将变性的质粒点在基点上，37℃保温2小时。

用dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于45℃的dd H_2O 中漂洗数次，约30分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为2uA（对Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离 Au 表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针 DNA 序列配对的 DNA 序列，即含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因。

本实施例与实施例一相比，仅在待检测的特异性 DNA 序列发生变化，结果表明，该专利方法中的特异性 DNA 区域的序列可以进行变化，即该专利方法可以用来检测多种特异性 DNA 的存在。

实施例五

本例仍为电子基因芯片的制备与检测例，其中芯片的制备与处理同实施例一。简述过程如下：

合成或购买结构如下所示的 DNA 序列：

5'-NH_2-$(CH_2)_3$-GCG AG—$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$—CT CGC-$(CH_2)_6$-SH-3'

$\boxed{\text{AACGTCAAAGTAGCTGTCCTTGAT}}$为本实验中选用的特异性DNA序列，是短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因中的一段，与之相应，用于杂交的DNA选用含有这段基因的PCR产物。

人工将制备好的DNA探针(1 uL, 1 mM)点在基点上，覆盖表面后室温过夜。3’-SH与Au的化学反应形成S—Au键，实现表面分

子自组装，从而完成DNA的固定。

将含有5 uL,3 mM电化学基团（羧基二茂铁）的溶液点在已固定的DNA表面，再加入10 mM EDC/10 mM NHS，反应1h。

将硅片浸于10 mM的SH-$(CH_2)_6$-OH乙醇溶液中，等待杂交。用于电信号检测的基因芯片制作完成。

将芯片取出，用电化学工作站测定基点的电信号，为10uA（vs. Ag/AgCl，200mv）。

将短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因的PCR产物（5uL ，约0.5ug）沸水浴5分钟，迅速置于冰上，使DNA变性。

将变性的pUC18 质粒点在基点上，37℃保温2小时。

用dd H_2O 清洗芯片，并将芯片置于45℃的dd H_2O 中漂洗数次，约30分钟。

取出芯片，再次用电化学工作站测定基点的电信号，为2uA（对Ag/AgCl，200mv，该信号为检测本底信号）。证明芯片上由于茎环结构的破坏，电信号基团远离Au表面，而引起了电化学信号的消失。证明样品中含有与探针DNA序列配对的DNA序列，即含有短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因。

本实施例与实施例四相比，仅在样品的来源发生变化，实施例四中样品为提取的质粒DNA，本实施例中样品为PCR的产物。结果表明，该专利方法所需样品可来自多种不同的方法。

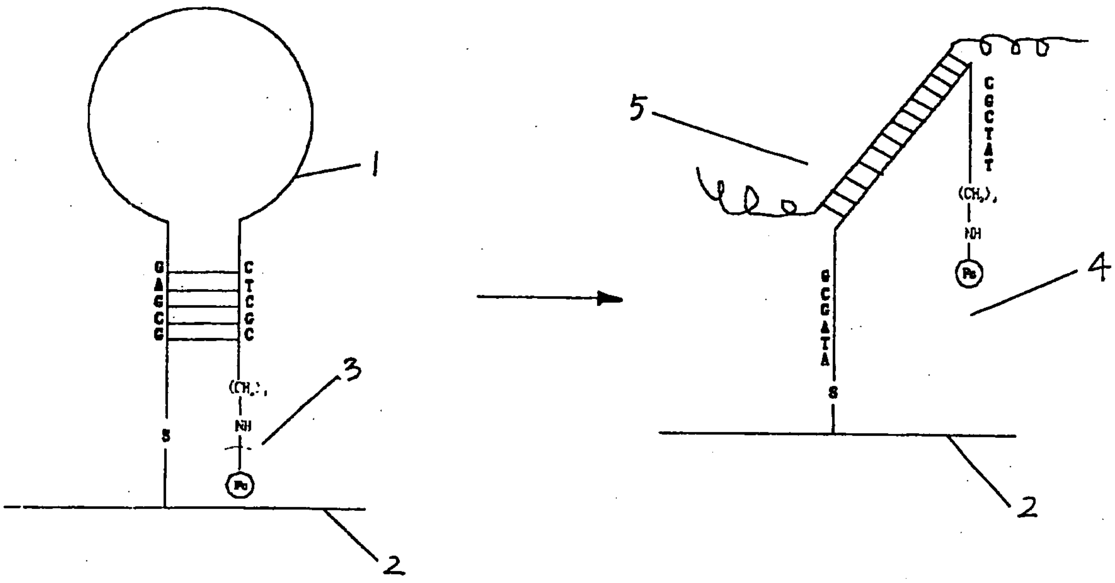

1
G
A
G
C
G
C
T
C
G
C
$(CH_2)_n$
NH
Fc
S
3
2
5
G
C
G
A
T
A
S
C
G
C
T
A
T
$(CH_2)_n$
NH
Fc
4
2

图 1

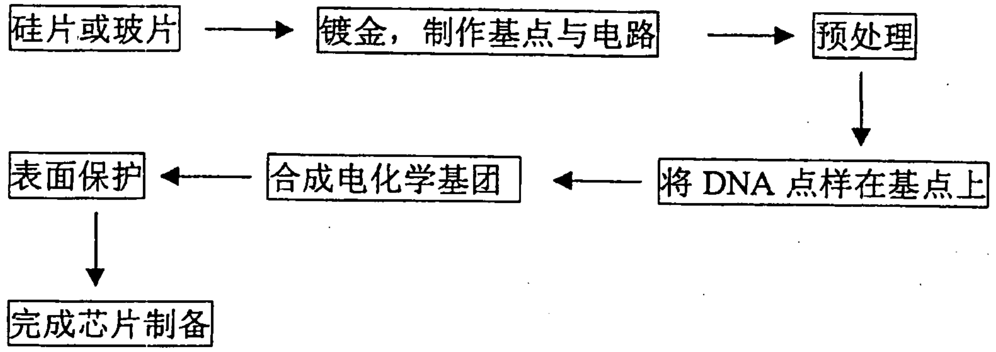

硅片或玻片
镀金，制作基点与电路
预处理
将 DNA 点样在基点上
合成电化学基团
表面保护
完成芯片制备

图 2